

artificialmente inoculate con sei differenti specie di *Penicillium* (*P. crustosum*, *P. bialowiezense*, *P. glabrum*, *P. expansum*, *P. solitum* e *P. brevicompactum*).

Le sei diverse specie utilizzate per le inoculazioni hanno, secondo i dati da letteratura, profili metabolici differenti e sono quindi in grado di produrre solo alcuni degli analiti in esame. In generale, tutti i campioni sono risultati positivi alla presenza degli analiti notoriamente prodotti da ciascuna specie. In particolare, la micotossina roquefortina C è stata prodotta dagli isolati di *P. bialowiezense*, *P. crustosum* e *P. brevicompactum* anche in concentrazioni molto elevate su entrambe le matrici. La produzione di questo analita su castagna è risultata essere fino a 100 volte superiore rispetto a quella su nocciola. L'acido micofenolico, notoriamente prodotto da *P. bialowiezense* e *P. brevicompactum* è stato effettivamente rivelato in entrambe le matrici.

Il metodo potrebbe quindi permettere di estrarre e quantificare gli analiti anche in campioni naturalmente contaminati, rendendo possibile così una rapida valutazione della commerciabilità dei prodotti.

### Ringraziamenti

*Il presente lavoro è stato svolto con un contributo del progetto Tecnologie innovative per garantire la qualità e la sicurezza delle castagne piemontesi - INNO-CHEST', finanziato dalla Fondazione Cassa di Risparmio di Torino.*

### Lavori citati

ABDULKADAR, A.H.W.; AL-ALI, A.; AL-JEDAH, J. (2000) - Aflatoxin contamination in edible nuts imported in Qatar. *Food Control*. 11, 157-160.

FRISVAD, J.C. (1987) - High performance liquid chromatographic determination of profiles of mycotoxins and other secondary metabolites. *Journal of Chromatography*. 392, 333-347.

## Sviluppo di LAMP come metodo per l'identificazione di *Pythium ultimum* in campo

**Sara Franco Ortega\*** - **Giovanna Gilardi\*** - **Davide Spadaro\*,\*\*** - **Maria Lodovica Gullino\*,\*\*** - **Angelo Garibaldi\***

*\*Centro di Competenza per l'Innovazione in campo agro-ambientale AGROINNOVA - Università degli Studi di Torino - Grugliasco (TO)*

*\*\*Dipartimento di Scienze Agrarie, Forestali ed Alimentari, DISAFA -Università degli Studi di Torino - Grugliasco (TO)*

Le tecniche di amplificazione di acidi nucleici si usano nel campo della diagnosi data la loro velocità, specificità e semplicità. La LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) permette l'amplificazione di poche copie di DNA in meno di un'ora in condizioni isoterme, con alta sensibilità e specificità per il target usato (Notomi *et al.*, 2000).

Questa tecnica permette di determinare la presenza del patogeno basandosi sull'amplificazione di un DNA target, utilizzando 6 diversi primer (F3, B3, loopF, loopB, FIP and BIP) progettati su otto regioni vicine all'interno della regione scelta. La rivelazione del prodotto positivo può essere visualizzata usando gel di agarosio, turbidimetria o attualmente con tecniche più avanzate come la real time PCR. Gli strumenti Genie II/Genie III permettono in meno di mezz'ora di determinare la presenza del patogeno in campo dopo un'estrazione veloce del DNA, e costituiscono un grande vantaggio per il monitoraggio dei patogeni in campo.

*Pythium ultimum* appartiene alla famiglia Pythiaceae, nella classe Oomycota. Fa parte del gruppo I della classificazione del genere *Pythium* (Lévesque e De Cock, 2004) ed è l'agente responsabile di marciumi radicali in diverse colture economicamente importanti.

I primer per lo sviluppo della LAMP per la determinazione di *Pythium ultimum* sono stati progettati sulla regione che codifica per la beta-tubulina (Btub). (Fig.1). Per determinare la specificità dell'amplificazione sono state utilizzate specie filogeneticamente vicine a *Pythium ultimum*, tra cui *P. irregulare*, *P. aphanidermatum*, *P.*

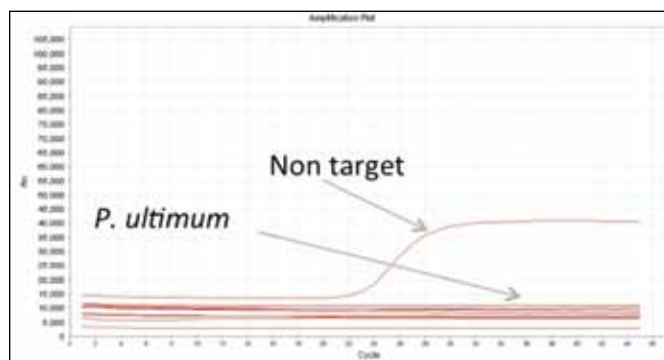


Figura 1 - LAMP sviluppata per l'identificazione di *Pythium ultimum*. I primer sono stati progettati sul gene della beta tubulina.

Figure 1 - LAMP carried out by Real Time PCR, for the detection of *Pythium ultimum*. Primers were designed based on beta tubulin sequence.

*dissotocum* e *P. cylindrosporum*, e non è stata ottenuta alcuna amplificazione positiva per questi campioni. La sensibilità è stata valutata mediante diluizioni seriali di DNA di *P. ultimum* con un limite di determinazione di 0,925 fg di DNA.

Ulteriori analisi sono in corso per determinare l'efficacia della tecnica direttamente in campo utilizzando un'estrazione veloce di DNA allo scopo di effettuare un più rapido intervento in caso di presenza del patogeno.

### Ringraziamenti

Lavoro svolto nell'ambito del programma Horizon 2020 UE, No 634179 "Effective Management of Pests and Harmful Alien Species - Integrated Solutions" (EMPHASIS).

### Lavori citati

LÉVESQUE A., DE COCK, A. (2004). Molecular phylogeny and taxonomy of the genus *Pythium*. *Mycological Research*. 108, 1363–1383.

NOTOMI T., OKAYAMA H., MASUBUCHI H., YONEKAWA Y., WATANABE K., AMINO N., HASE T. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*. 28, E63.

## Caratterizzazione molecolare e del profilo metabolico di isolati di *Alternaria* sp. da basilico

Sara Franco Ortega\* - Ilenia Siciliano\* - Pietro Bosio\* - Maria Lodovica Gullino\*,\*\* - Angelo Garibaldi\*

\*Centro di Competenza per l'Innovazione in Campo Agroambientale, AGROINNOVA - Università degli Studi di Torino – Grugliasco (TO)

\*\* Dipartimento di Scienze Agrarie, Forestali ed Alimentari, DISAFA – Università degli Studi di Torino - Grugliasco (TO)

Il basilico (*Ocimum basilicum* L.) è un'erba aromatica appartenente alla famiglia delle *Lamiaceae* di grande importanza economica per i paesi mediterranei. In presenza di attacchi di *Alternaria alternata* su basilico è possibile osservare lesioni marroni-nere circondate da un alone giallo nelle foglie più vecchie, che portano ad una progressiva defogliazione della pianta.

I caratteri morfologici sono stati normalmente utilizzati per l'identificazione delle specie di *Alternaria*, tuttavia l'identificazione molecolare o la caratterizzazione mediante la produzione di metaboliti secondari dovrebbe essere tenuta in considerazione per migliorare la separazione delle diverse specie appartenenti al genere *Alternaria*. Sono state effettuate molte riclassificazioni del genere, a causa di dati discordanti ottenuti con diversi metodi utilizzati per l'identificazione, attribuendo attualmente 27 sezioni al genere (Lawrence *et al.*, 2016).

La caratterizzazione molecolare degli isolati ottenuti da basilico è stata effettuata mediante analisi multilocus,

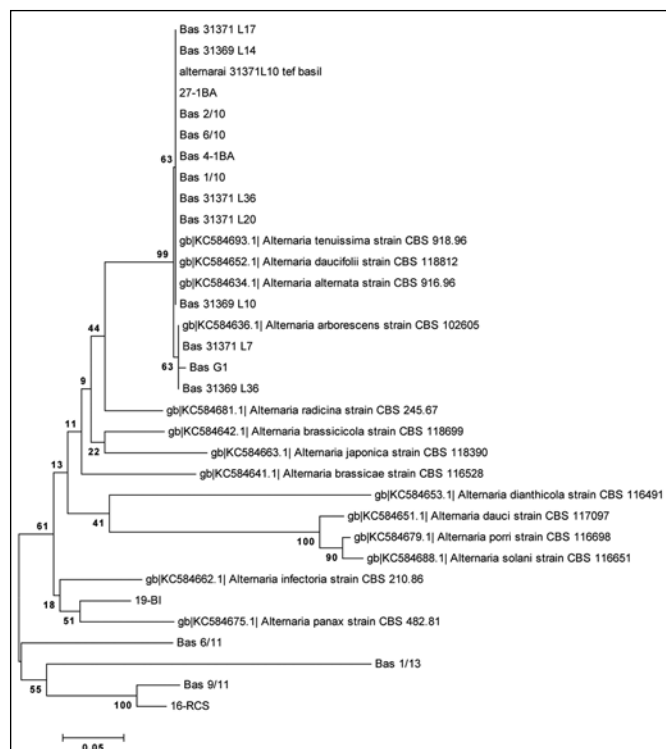


Figura 1 - Analisi (Neighbor –joining) della relazione filogenetica basata sul gene elongation factor 1- $\alpha$  (EF-1 $\alpha$ ) di *Alternaria* spp.

Figure 1 - Neighbor-Joining tree with Tajima Nei model and 1000 bootstraps of support of the EF-1alpha gene showing the phylogenetic relationship of the isolates of *Alternaria* isolated from basil.